

Universitat de Lleida

FACULTAD DE MEDICINA

Grado en Nutrición Humana y Dietética

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LOS
COMPUESTOS FENÓLICOS CARACTERÍSTICOS DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN LA PREVENCIÓN DE
LA ATHEROSCLEROSIS: APLICACIÓN EN UN MODELO DE
RATÓN APOE DEFICIENTE**

Alumno: Luis Enrique Inocente Bolarte

Junio de 2015

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LOS
COMPUESTOS FENÓLICOS CARACTERÍSTICOS DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN LA PREVENCIÓN DE
LA ATHEROSCLEROSIS: APLICACIÓN EN UN MODELO DE
RATÓN APOE DEFICIENTE**

Trabajo de Final de Grado presentado por: Luis Enrique Inocente
Bolarte

Tutora: María José Motilva Casado

Cotutora: María del Carmen López de las Hazas Mingo

Índice

1. Resumen	1-3
2. Antecedentes	4-10
3. Justificación del estudio	11
4. Procedimiento de investigación	12-17
5. Resultados y discusión	17-30
6. Conclusiones	30-31
7. Bibliografía	32-34

1. Abstract

Oxidation of low density lipoproteins (LDL) plays a key role in early atherogenesis. It has been hypothesized that counteracting LDL oxidation by antioxidants can improve and even prevent the development of atherosclerosis.

Phenols of extra virgin olive oil (AOVE) have a potential role in improving physiopathology of atherosclerosis, counteracting LDL oxidation, among other effects.

In this study we used extracts containing a lot of secoiridoides, AOVE phenolic compounds, to enrich the feed of Knockout ApoE mice, with the aim of studying the antiatherosclerotic action produced by secoiridoides.

In preliminary results, there were beneficial effects of secoiridoides after analyzing samples of liver, gall bladder, heart and aorta of mice. However, the study continues and definitive results are not available.

Resum

L'oxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) exerceix un paper clau a l'aterogènesi. S'ha formulat la hipòtesi de que contrarestar l'oxidació de les LDL mitjançant antioxidants pot millorar i fins i tot prevenir l'aparició d'aterosclerosi.

Els fenols de l'oli d'oliva verge extra (AOVE) tenen un paper potencial en la millora de la fisiopatologia de l'aterosclerosi, contrarestant l'oxidació de les LDL, entre d'altres efectes. En aquest estudi utilitzem extractes rics en secoiridoides, compostos fenòlics del AOVE, per enriquir el pinso de ratolins ApoE deficients (més propensos a tenir aterosclerosi), amb l'objectiu d'estudiar l'acció antiateroscleròtica produïda pels secoiridoides.

Als resultats preliminars, es van veure efectes beneficiosos dels secoiridoides del AOVE després d'analitzar mostres de fetge, vesícula biliar, cor i aorta dels ratolins. No obstant això, l'estudi està encara en curs i no es disposen de resultats definitius.

Resumen

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeña un papel clave en la aterogénesis temprana. Se ha formulado la hipótesis de que contrarrestar la oxidación de las LDL mediante antioxidantes puede mejorar e incluso prevenir la aparición de aterosclerosis.

Los fenoles del aceite de oliva virgen extra (AOVE) tienen un rol potencial en la mejora de la fisiopatología de la aterosclerosis, contrarrestando la oxidación de las LDL, entre otros efectos.

En este estudio utilizamos extractos ricos en secoiridoides, compuestos fenólicos del AOVE, para enriquecer el pienso de ratones ApoE deficientes (más propensos a tener aterosclerosis), con el objetivo de estudiar la acción antiaterosclerótica producida por los secoiridoides.

En los resultados preliminares, se vieron efectos beneficiosos de los secoiridoides del AOVE después de analizar muestras de hígado, vesícula biliar, corazón y aorta de los ratones. Sin embargo, el estudio está todavía en curso y no se disponen de resultados definitivos.

2. Antecedentes

En la última década, se ha desarrollado un gran interés en los potenciales efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos como antioxidantes. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado en varias ocasiones que el consumo a largo plazo de dietas ricas en compuestos fenólicos ofrece protección contra el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (1) (2). La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla en las regiones más propensas a tener lesión de las arterias medianas. Las lesiones ateroscleróticas pueden estar presentes y clínicamente silentes durante décadas antes de convertirse en activas y producir condiciones patológicas tales como infarto agudo de miocardio, angina inestable o muerte cardíaca súbita. Los principales factores de riesgo para la aparición de aterosclerosis incluyen altas concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma y modificaciones de estas lipoproteínas, tales como su retención, oxidación y agregación (3). La activación de las plaquetas en sangre también contribuye a acelerar la aterosclerosis. Se cree que la modificación de la oxidación de las LDL desempeña un papel clave durante la aterogénesis temprana. Las moléculas de LDL oxidadas son tomadas por los macrófagos a través de sus receptores de sustancias de desecho, que conduce a la transformación de éstos en células espumosas cargadas de lípidos, el sello distintivo de la formación de la aterosclerosis (3) (fig. 1).

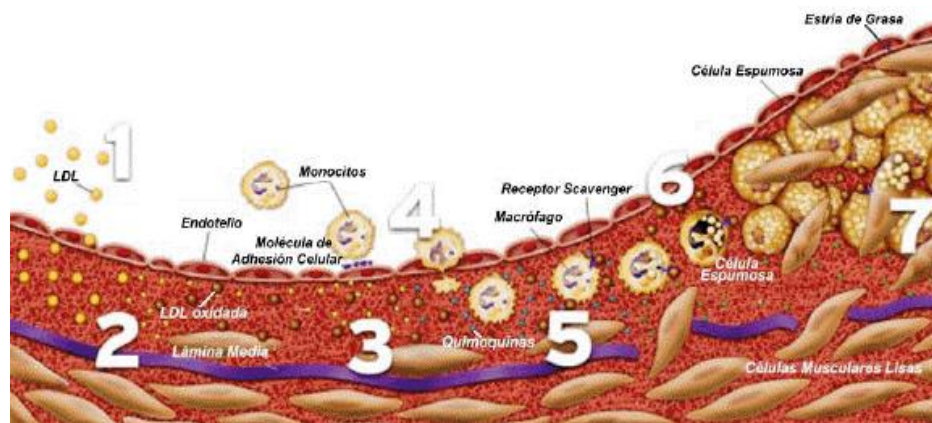


Figura 1: Etapas en el establecimiento de la placa aterosclerótica. 1 y 2: Entrada de las lipoproteínas hacia el subendotelio y posterior modificación. 3, 4 y 5: Liberación de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la diapédesis de monocitos adicionales hacia la íntima y su diferenciación en macrófagos. 6: Formación de células espumosas debido a la internalización de lipoproteínas modificadas y oxidadas 7: Establecimiento de la estría de grasa debido a la acumulación de células espumosas.(4) .

Varias líneas de investigación indican que los factores de riesgo clásicos de padecimiento de enfermedad coronaria, como por ejemplo tener niveles de colesterol sérico alto y la presión arterial elevada no son muy diferentes entre las poblaciones de la zona del Mediterráneo - donde la incidencia de enfermedades

del corazón y ciertos tipos de cáncer, por ejemplo: de mama y colon, es más bajo - y las de otros países del norte y oeste de Europa. Además, existen estudios observacionales que no relacionan directamente la incidencia de cardiopatía coronaria con la ingesta y absorción de grasa. Estos datos sugieren que otros factores de riesgo, aún inexplorados, pueden verse favorablemente afectados por una dieta saludable. Esta evidencia, junto con varios estudios que relacionan directamente la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con la aparición de la aterosclerosis, ha llevado a la formulación de la hipótesis de que contrarrestar la oxidación de las LDL mediante antioxidantes puede mejorar e incluso prevenir la aparición de aterosclerosis.

2.1 Especies reactivas de oxígeno

Los organismos aerobios están expuestos a la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno). Estas especies de oxígeno no reducidas completamente son subproductos tóxicos, generados a bajos niveles en las células en condiciones de no estrés. En condiciones de estrés se generan cantidades extra de ROS, por ejemplo en el caso de las plantas las condiciones de estrés implican ataques por patógenos, exposición a la luz UV, contaminación por metales pesados, entre otros.

Se sabe que el ROS daña las membranas celulares induciendo peroxidación lipídica, también daña el DNA y las proteínas. Sin embargo el ROS también tiene funciones beneficiosas, por ejemplo se sabe que el ROS no sólo actúa como protector directo contra los patógenos invasores, sino también activando señales de reacciones adicionales (5).

Los ROS más populares son: O_2 (radical superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), y OH (radical hidroxilo) (5).

2.2 Sistemas de defensa contra el ROS

Los organismos aerobios han desarrollado complejos sistemas protectores de los ROS, que consisten en varias enzimas (**superóxido dismutasa** (SOD), **catalasa** (CAT), **ascorbato peroxidasa** (APX), **monodehidroascorbato reductasa** (MDAR), **dehidroascorbato reductasa** (DHAR) y **glutación reductasa** (GR)) y presencia de moléculas con carácter antioxidante (como el ácido ascórbico, glutatión, tocoferol y carotenoides) (6). Estos mecanismos pueden disminuir o incluso parar la oxidación de biomoléculas y bloquear el proceso de reacciones de oxidación en cadena (7). Los antioxidantes no enzimáticos son esenciales en la protección de componentes celulares de muchos ROS (8) (9).

2.3 Compuestos fenólicos y sus funciones en las plantas

Todas las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios. Estos metabolitos son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en las plantas debido a que no intervienen en su metabolismo primario, pero sí actúan como mecanismo de defensa. Intervienen cuando las condiciones ambientales son adversas, y en condiciones de estrés.

Uno de los grupos más importantes son los compuestos fenólicos. Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático llevando uno o más grupos hidroxilo. Son sintetizados principalmente a partir del ácido cinámico, el cual es formado a partir de la fenilalanina por la acción de la L-fenilalanina amonio-liasa **(10)**. La importancia de esta ruta se sustenta en el hecho de que, en condiciones de crecimiento normales, el 20% del carbono fijado por las plantas pasa por esta vía **(11)**. Los compuestos fenólicos se dividen en varios grupos, distinguidos por el número de átomos de carbono constituyentes en conjunción con la estructura del esqueleto fenólico básico: fenoles simples, estilbenos, chalconas, lignanos, curcuminoides, taninos (taninos condensados, complejos e hidrolizables), flavonoides (flavonoles, flavanoles, antocianinas, flavanonas, flavanonoles, flavonas e isoflavonas) **(fig. 2)**.

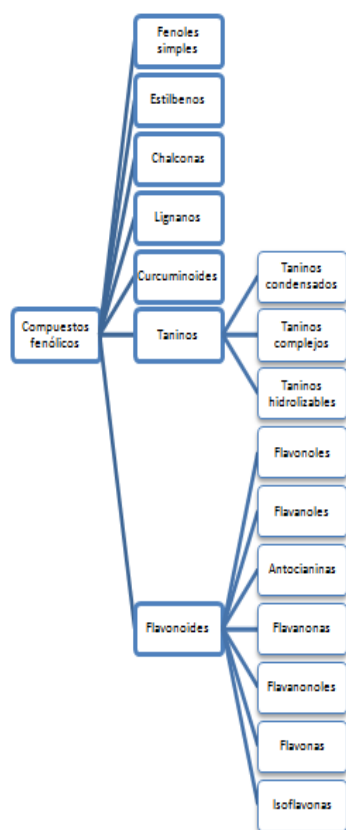


Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos más comunes de las plantas.

2.4 Distribución de los compuestos fenólicos en las plantas y factores que afectan a su contenido

La distribución de los compuestos fenólicos en las plantas no es uniforme, tanto a nivel de tejidos como a niveles celulares y subcelulares. Hay fenoles que son específicos de algunos vegetales, por ejemplo: los lignanos se encuentran principalmente en el centeno, trigo, sésamo y lino, los estilbenos se encuentran en las uvas. Hay fenoles que se encuentran en todos los productos vegetales, por ejemplo: los flavonoides o los ácidos fenólicos. En la mayor parte de los casos los alimentos son una mezcla compleja de diferentes compuestos fenólicos.

Numerosos factores afectan al contenido en fenoles de las plantas, como el grado de madurez en el momento de la cosecha, factores ambientales, factores edáficos como tipo de suelo, la exposición al sol, la lluvia, procesamiento, almacenamiento etc. Estos últimos conducen a cambios en la calidad de los alimentos, en particular en color y características organolépticas (12). El grado de madurez afecta considerablemente las concentraciones y proporciones de los diversos polifenoles. En general, se ha observado que el contenido de ácidos fenólicos disminuye durante la maduración, mientras que las concentraciones de antocianinas aumenta (12).

2.5 Absorción y biodisponibilidad de los fenoles

No existe una relación entre la cantidad de fenoles presentes en los alimentos y su biodisponibilidad en el cuerpo humano. Generalmente, las formas agliconas (compuestos no glucídicos) pueden ser absorbidas desde el intestino delgado; sin embargo la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos en forma de ésteres glucósidos (moléculas compuestas por un glúcido, generalmente monosacáridos, y un compuesto no glucídico) o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa (sin sufrir ninguna modificación). Antes de la absorción, estos compuestos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microbiota colónica. Durante el curso de la absorción, los fenoles se someten a una amplia modificación; de hecho, se conjugan en las células intestinales y más tarde en el hígado por metilación, sulfatación y / o glucuronidación. La metilación de los fenoles es bastante específica, ya que generalmente se produce en la posición C3 del fenol, pero podría producirse en la posición C4. La sulfatación se produce principalmente en el hígado, pero la posición de los fenoles en el proceso no ha sido claramente identificada (13). La glucuronidación se produce tanto en el intestino como en el hígado. La tasa más alta de conjugación se observa en la posición C3 (13). Los mecanismos de conjugación son muy eficientes y las agliconas libres son generalmente inexistentes o presentes en bajas concentraciones en el plasma después del consumo de dosis nutricionales de fenoles; una excepción son las catequinas del té verde, cuyas agliconas pueden constituir una proporción significativa de su cantidad total en el plasma. Como consecuencia, las moléculas que circulan en el plasma y llegan a los tejidos son diferentes de los

presentes en los alimentos y es muy difícil identificar todos los metabolitos y evaluar su actividad biológica. Los fenoles más comunes en nuestra dieta no son necesariamente los que muestran mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana, lo importante es que, es la estructura química de estos compuestos fenólicos y no su concentración la que determina la velocidad, grado de absorción, naturaleza y actividad biológica de los metabolitos.

2.6 Compuestos fenólicos y su capacidad antiaterogénica

Los fenoles son potentes inhibidores de la oxidación de LDL (factor clave en el desarrollo de aterosclerosis). Además, los compuestos fenólicos tienen efectos antiplaquetarios, antiinflamatorios, así como la capacidad de aumentar el colesterol HDL, mejorar la función endotelial y estabilizar la placa de ateroma, por lo que pueden ejercer un efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares.

2.7 Efectos beneficiosos de los fenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra en la aterosclerosis

El presente estudio se centra en los efectos antiateroscleróticos ejercidos por los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra (AOVE). Existen evidencias de que en las zonas del mediterráneo, donde este alimento se produce y consume tradicionalmente, los índices de aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares son menores que en otros países de Europa (14).

Los efectos beneficiosos para la salud producidos por el AOVE se atribuyeron, en un principio, a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGM). Se planteó la hipótesis de que la suplementación con AGM mejoraba la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). No obstante, muchos estudios discutían esta hipótesis argumentando de que los efectos beneficiosos de los AGM en los lípidos plasmáticos eran todavía controvertidos: mientras que algunos estudios atribuyen un efecto indirecto de los AGM en el colesterol plasmático a través de la sustitución de los ácidos grasos saturados, otros atribuyen un efecto directo, aunque modesto, de los AGM por sí solos, reduciendo los niveles de colesterol cuando éstos sustituyen equicalóricamente a los carbohidratos (15).

Experimentos *in vitro* demostraron que el compuesto fenólico más representativos del AOVE: el hidroxitirosol (**fig.3**), cuyo precursor es la oleuropeína, la cual se presenta en mayor cantidad en las hojas del olivo que en el fruto, actúa como quelante de metales y neutralizador de radicales libres, también presenta un efecto de barrido del ácido hipocloroso (HOCL), especie de oxidante potente producido *in vivo* por los neutrófilos activados en el sitio de la inflamación. La propiedad eliminadora del HOCL del hidroxitirosol puede tener consecuencias importantes en términos de protección de la aterosclerosis: se

está acumulando evidencia de que la formación de cloraminas a través de la formación de mieloperoxidasa catalizada del HOCl y posterior cloración de ApoB-100 es la responsable de la modificación de LDL y la peroxidación (15) (16). Los fenoles presentes en el AOVE tienen un rol potencial en la mejora de la fisiopatología de la aterosclerosis, provocando una mejora en el perfil lipídico, reduciendo la hiperactividad plaquetaria, la trombogenicidad endotelial y la severidad de las lesiones de la pared vascular y endotelial (17) (18).

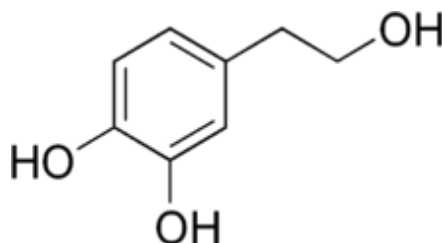


Fig. 3: Estructura química del hidroxitirosol.

En un estudio realizado por NR Damasceno se administró AOVE con un contenido especialmente alto en compuestos fenólicos a los participantes voluntarios que experimentaron una reducción del 7,3% de las LDL con respecto a los valores basales (19).

Algunos estudios evidencian que los compuestos formados en el metabolismo de segunda fase, a partir del hidroxitirosol, podrían tener una función todavía más importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Algunos de estos compuestos son: el hidroxitirosol sulfato y el hidroxitirosol glucurónido, entre otros.

2.8 Procesos de extracción del aceite de oliva virgen extra

Aunque el AOVE contiene compuestos fenólicos con efectos beneficiosos para la salud cardiovascular, la mayor parte de la fracción fenólica presente en la oliva queda retenida en el alperujo, residuo oleícola compuesto por el resto de componentes de la oliva; agua, hueso, piel, mesocarpio y restos grasos. Durante la extracción del AOVE sólo una pequeña cantidad (1-2%) de fenoles entran a formar parte de la fase oleosa, mientras que el 98% restante queda incluido en la matriz del alperujo. Estos productos de desecho tienen un enorme valor potencial.

Actualmente, los métodos utilizados para la obtención del AOVE son los siguientes:

- a) **Extracción por presión.-** Es el sistema tradicional, actualmente en desuso. Consistía en molturar la aceituna en molinos de piedra llamados empiedros, batir la pasta en una batidora y extraer el aceite

prensando la pasta obtenida de las etapas anteriores. Este proceso era discontinuo y requería gran cantidad de mano de obra para llevarlo a cabo (20).

b) Extracción continua por centrifugación.- En los años 70 del siglo XX comienza la instalación en las almazaras de los llamados sistemas continuos, que cambian las prensas por decantadores que permiten extraer el aceite del resto de la pasta mediante centrifugación, y los empiedros son sustituidos por molinos metálicos que permiten operar en continuo. Dentro de este sistema de centrifugado se distinguen dos tipos de metodología: (20).

- *Sistema de Centrifuga de 3 fases:* Es el “más tradicional”. Estos primeros decantadores se conocen como decantadores de tres fases debido a que en ellos había tres salidas de productos: aceite, alpechín (fase acuosa) y orujo (fase sólida). Este tipo de sistemas requiere la adición de gran cantidad de agua y generaba, por tanto, gran cantidad de alpechín, lo que suponía un problema medioambiental serio, puesto que se trata de un residuo de elevada carga contaminante.
- *Sistema de centrifuga de 2 fases:* A principios de los noventa se introduce un nuevo tipo de decantador: el decantador de dos fases. Este sistema se diferencia de las tres fases en que no es necesaria la adición de grandes cantidades de agua al decantador y en que presenta únicamente dos salidas: aceite y alperujo u orujo de dos fases, que está formado por el alpechín y el orujo.

2.9 Ratón ApoE deficiente y aterosclerosis

En este estudio se utilizaron ratones C57/BL6, a los que se les realizó un knock-out de la apolipoproteína E (ApoE). La ApoE se sintetiza en el cromosoma 19 y es la principal apolipoproteína presente en los quilomicrones. La ausencia de ApoE impide que las partículas remanentes de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) puedan eliminarse por el hígado, por lo que se acumulan en el plasma y finalmente se depositan en el espacio subendotelial de las paredes arteriales. Por ello, en el ratón deficiente en ApoE alimentado con la dieta estándar, se desarrolla una extensa aterosclerosis. La complejidad de las lesiones, facilidad de generación espontánea en un corto periodo de tiempo, junto con la semejanza del modelo con la enfermedad humana, lo convierten en un sistema atractivo para estudiar los factores predisponentes, tanto ambientales como genéticos, de la aterosclerosis (21). Entre los factores ambientales hay que destacar la dieta como uno de los más importantes. En este campo, el empleo del ratón carente de la ApoE está aportando una importante valoración biológica, tanto de la influencia de los diferentes componentes de la dieta como de los compuestos fenólicos en el desarrollo de la arteriosclerosis y de los mecanismos implicados (21).

3. Justificación del estudio

El objetivo principal del presente trabajo se centra en el estudio de la acción antiaterosclerótica producida por los fenoles de la oliva: conocer cuáles son los órganos diana, donde se depositan y en qué cantidad lo hacen, para poder así, establecer los mecanismos de acción por los cuales ejercen el efecto beneficioso.

A lo largo del estudio se realizaron análisis bioquímicos, de orina y de heces. Tras el sacrificio, se recogerán los tejidos para poder realizar análisis histológicos mediante microcortes, con la finalidad de evaluar la integridad celular, la acumulación de grasas y la formación de placas de ateroma.

El extracto empleado (procedente de alperujo de oliva) es rico en secoiridoides. Estos derivados de la oleuropeína, a la vez, son precursores del hidroxitirosol y del ácido elenólico, entre ellos destacan: La forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol (p-HPEA-EDA), la forma aldehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EA) y la forma aldehídica del ácido elenólico unida al tirosol (p-HPEA-EA) (22). Podría ser que el ácido elenólico y sus derivados tengan también propiedades antioxidantes y aporten beneficios en el tratamiento de la aterosclerosis, pero a nivel científico la principal dificultad para comprobar la capacidad antioxidante de estos compuestos es que no existen patrones comerciales de síntesis química, por lo que dificulta el estudio de sus efectos a nivel *in vivo* o *in vitro*, ya que al ser un compuesto que se encuentra en muy poca cantidad en el AOVE su aislamiento para poder conseguir una cantidad suficiente que permita realizar el estudio es muy complicado.

Para llevar a cabo el cumplimiento del objetivo principal se elaboró un extracto de alperujo de oliva mediante el uso de líquidos presurizados (PFE, Pressurized Fluid Extraction) con el equipo ASE (Accelerated Solvent Extraction) y posterior aislamiento de los compuestos fenólicos típicos de la oliva mediante la purificación del extracto mediante el empleo de SPE (Solid Phase Extraction).

Una vez obtenido el extracto, se preparó la dieta enriquecida en dicho extracto rico en fenoles. Posteriormente se llevó a cabo la intervención dietética en ratones con ApoE deficiencia de 6 semanas de vida durante un periodo de 12 semanas.

El objetivo secundario es realizar una búsqueda bibliográfica en bases de datos científicos sobre los últimos estudios publicados sobre el tema, que permitirá discutir los resultados del presente estudio y extraer conclusiones acerca del tema en cuestión a partir de los datos científicos recopilados de diferentes autores.

4. Procedimiento de investigación

1º etapa

Elaboración del extracto rico en fenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra

Se prepararon extractos ricos en fenoles procedentes del alperujo de oliva, mediante extracción con fluidos presurizados, con el fin de enriquecer el pienso de los ratones con ApoE deficiencia. En la extracción con fluidos presurizados (PFE, Pressurized Fluid Extraction) con el equipo ASE (Accelerated Solvent Extraction), los analitos se extraen de la matriz sólida empleando altas temperaturas (40-200°C) y presiones elevadas (1000-3000 psi). La mayor eficiencia en la extracción es debida a dos procesos:

- *Solubilidad y transferencia de masa:* el trabajo a temperatura elevada provoca un aumento en la solubilidad del analito en el disolvente, una rápida difusión y una mejor transferencia de masa.
- *Interrupción del equilibrio en superficie:* las temperaturas elevadas anulan las interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y atracción bipolar, además disminuyen la viscosidad y la tensión superficial provocando una mayor penetración del disolvente en la matriz. El empleo de presiones elevadas permite el uso de disolventes a temperaturas superiores a su punto de ebullición y permiten también una mayor penetración del disolvente en la muestra, lo cual evita que se evapore el etanol y el agua (compuestos del disolvente utilizado), consiguiendo los beneficios de extracción del agua líquida al tener las partículas en contacto y en fricción, así se puede disminuir el tiempo de análisis, el gasto de disolvente y se aumenta la extracción de compuestos.

Un extractor de fluidos presurizados está formado (**fig. 4**) por un suministro de disolvente, una fuente de nitrógeno, una bomba, una celda de extracción, un horno y un sistema de colección de extractos. Las celdas de extracción son de acero, para aguantar las altas temperaturas y presiones a la que la muestra es sometida. La muestra liofilizada es mezclada con un agente desecante (tierras de diatomeas), y se añaden bolas de vidrio con el fin de rellenar todo el espacio de la celda. En los dos extremos de la celda se coloca un filtro de celulosa para evitar el paso de sólidos por las líneas de conducción del extracto y evitar posibles obturaciones.

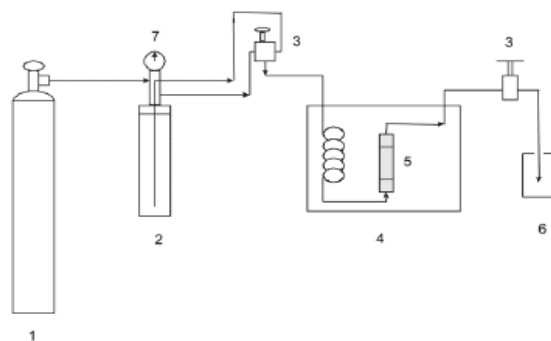


Figura 4: Esquema de un sistema de extracción con fluidos Presurizados con el equipo ASE. 1: Tanque de nitrógeno, 2: Conducto de presión, 3: Válvulas, 4: Horno, 5: Celda de extracción, 6: Recipiente colector, 7: Manómetro.

Se introdujeron en la celda de extracción 10g de alperujo de AOVE y 5g de tierra de diatomeas, luego la celda se introdujo verticalmente en el horno. Antes de empezar el proceso de extracción es necesario que el horno alcance la temperatura de extracción adecuada (80°C). Durante el proceso, el ASE introduce el disolvente (se utilizó una solución de 80% de etanol y 20% de agua Milli Q) en la celda de extracción por el extremo superior empleando una válvula y aplica presión. Este ciclo dura unos 5 minutos y se suele repetir una o dos veces más empleando disolvente nuevo, que arrastra el extracto al recipiente de colección. A continuación, se evapora el etanol.

Seguidamente, se juntaron en un vaso de precipitados los 34 extractos que se pudieron realizar con el equipo ASE y se les bajó el PH con ácido acético hasta un valor de 4. Luego se vertió el extracto en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron durante 20' a 9000 rpm a 20°C. En los sobrenadantes, a parte de los fenoles, puede haber proteínas, azúcares, enzimas, minerales, entre otros y es necesaria una filtración previa para que el cartucho de μ SPE no se obstruya. A continuación, con el fin de aislar los compuestos fenólicos que nos interesan para el estudio, se lleva a cabo una extracción en fase sólida con μ SPE (**fig.5**). El proceso de purificación tiene tres fases:

- *Fase 1 Acondicionamiento del cartucho de μ SPE:* Se acondiciona el cartucho de μ SPE para que no pasen por el filtro los fenoles que nos interesan. Primero se vierten en el cartucho 3 ml de metanol, a continuación, se añaden 3 ml de agua milli Q a PH 2,
- *Fase 2 Adición de la muestra:* se añade al cartucho 3 ml de orujo de oliva a PH 4 (a este PH los polifenoles tendrán más afinidad por quedarse en el filtro).
- *Fase 2 Lavado:* Se incorpora al cartucho de extracción 1 ml de agua Milli Q en el cartucho (el cual eliminaría los compuestos muy polares), seguidamente, 1 ml de Metanol al 5 % (el cual eliminaría los compuestos un poco apolares).

- **Fase 3 Desorción:** Finalmente se añaden 3 ml de una solución 80% metanol/20% para desorber los compuestos que hubiesen quedado retenidos

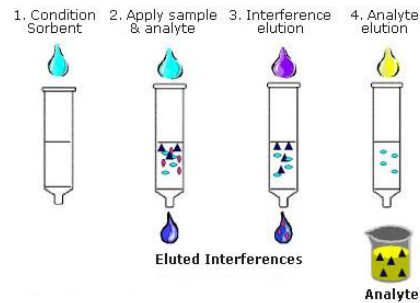


Fig. 5: Extracción en fase sólida con μ SPE

Se llevan las soluciones resultantes a evaporar para extraer el metanol que se utilizó en la desorción. Después de evaporar, se juntan las soluciones para tener un volumen fijo y se llevan a analizar por cromatografía con el objetivo de conocer la concentración de fenoles (mg/ml) existente para poder hacer las croquetas para los ratones. La concentración de secoiridoides (3,4-EDA en su mayoría) es de 3,52 mg sec. /ml. La dosis de secoiridoides para cada ratón es de 10mg/kg/día.

Para hacer las croquetas es necesario hacer una mezcla de agua, secoiridoides y pienso. Las croquetas se dejarán en el congelador a -80°C y posteriormente se realizará una liofilización de las mismas para extraer el agua.

Es necesario calcular periódicamente la cantidad de pienso y secoiridoides que necesita cada ratón conforme van creciendo. A continuación se muestra un esquema del proceso (**fig. 6**).

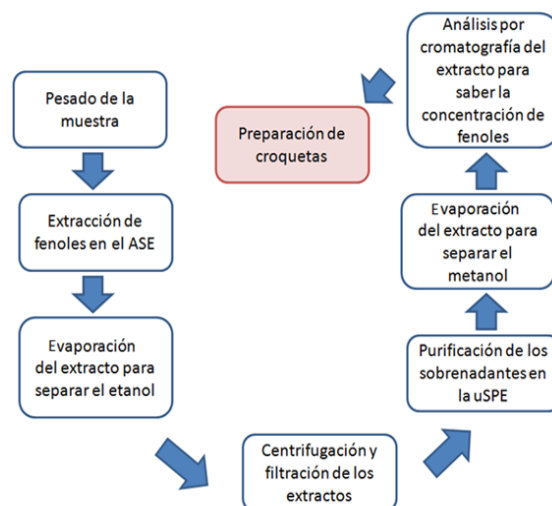


Figura 6: Elaboración de extracto rico en fenoles presentes en el aceite de oliva virgen extra.

2º etapa

Experimento *in vivo* con ratones ApoE deficientes

Para la determinación de la actividad antiaterogénica del extracto rico en fenoles procedentes de la oliva se diseñó un experimento con ratones ApoE deficientes. El estudio se formó con 20 ratones ApoE (10 machos y 10 hembras) y 8 ratones BL-6 (4 machos y 4 hembras), ratones que no tienen alteración de la regularización del colesterol. Los ApoE se dividieron: 3 individuos control y 7 individuos tratamiento de cada sexo. Para los ratones BL-6: 2 ratones control y 2 ratones tratamiento. El experimento con los ratones se inició en las primeras etapas de vida (6 semanas), pesaban alrededor de 20g y comían cada día unos 4 g de pienso. A continuación, se les dejó una semana (semana 7) *ad libitum*, es decir, comiendo a demanda (fig. 7) (fig. 8).

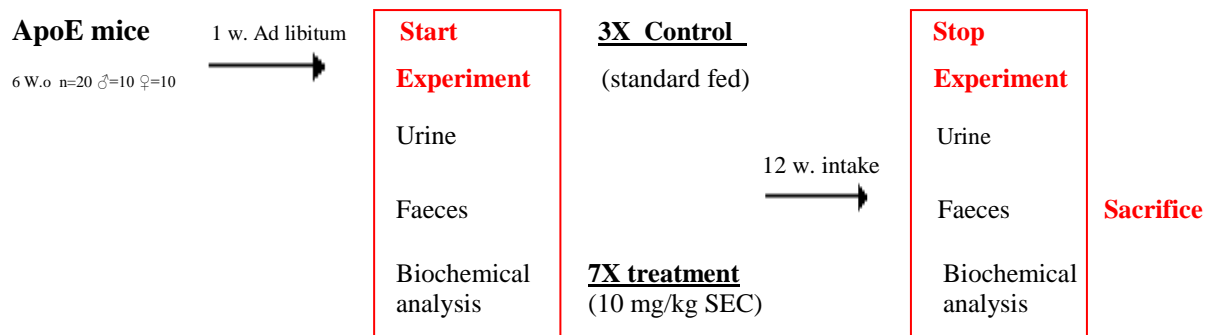


Figura 7: Proceso del experimento “in vivo” con ratones ApoE deficientes.

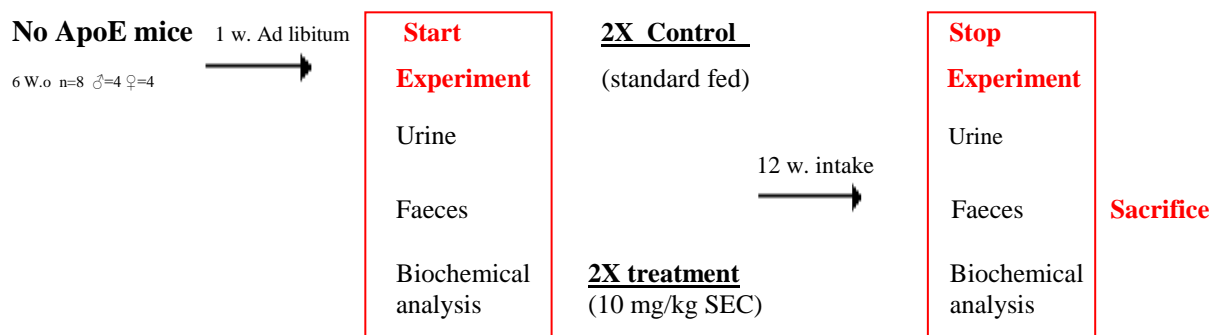


Figura 8: Proceso del experimento *in vivo* con ratones no ApoE deficientes

Iniciada la semana 8 se produjo el inicio del experimento. Antes de empezar éste, los ratones se introdujeron durante 24 h en una jaula metabólica, donde se les recolectó la orina y las heces a tiempo

cero. A continuación, durante 12 semanas los ratones ingirieron el tratamiento pertinente: pienso enriquecido con 10 mg/Kg de extracto de secoiridoides o pienso control. Cada semana se pesa a los ratones y se les calcula el consumo de pienso con el fin de ajustar semanalmente la dosis del tratamiento en función del peso e ingesta.

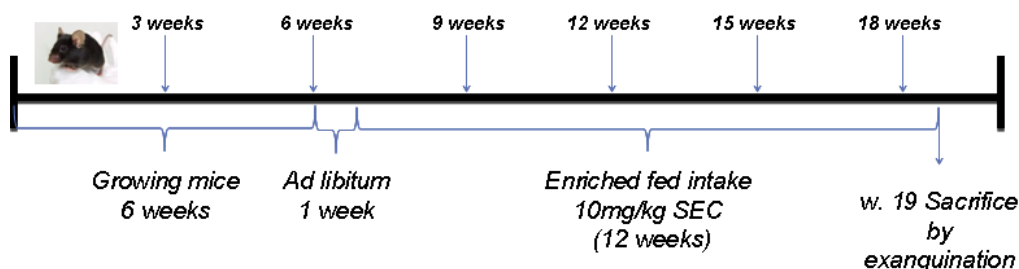


Figura 9: Cronograma del experimento “in vivo” con ratones ApoE deficientes.

En la semana 19, los ratones se metieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina y las heces. A continuación, fueron sacrificados con el fin de obtener suficiente volumen de sangre para hacer el análisis bioquímico y la extracción de diferentes tejidos (**fig. 9**). Los ratones se sedaron con isoflurano, a continuación se les realizó una obertura en el tronco hasta llegar al corazón, una vez allí, se les pinchó el ventrículo izquierdo y se les extrajo todo el volumen sanguíneo posible. Tras su muerte, se perfundieron con el fin de limpiar de irrigación sanguínea los tejidos. El proceso se llevó a cabo pasando solución salina (0,9% NaCl) a través del mismo ventrículo, para salir por la aurícula derecha aprovechando el bombeo del corazón. Los tejidos extraídos se pesaron inmediatamente, después, se dividieron entre congelados en nitrógeno líquido, para el análisis fenólico; o sumergidos en formol para su conservación y posterior tratamiento histológico. El tratamiento histológico consistió en realizar cortes a los tejidos desde diferentes ángulos y aplicar el método Oil Red Staining para poder observar los depósitos de grasa que se encontraban en ellos, los cuales serían visibles en color rojo.

El protocolo del método Red Oil Staining es el siguiente:

- a. Fijación de las muestras en Paraformaldehído al 4% 0,1 M pH 7.4 durante 24 h. a 4°C.
- b. Post fijación: Tampón fosfato 0,1M+sucrosa 30%, aproximadamente 48 hs. (hasta que la muestra se hunda).
- c. Se colocan las muestras en criomuelles, embebidas en OCT (Cryo-M-Bed, Bright Instrument company Limited, Huntingdon, England) y conservadas a -80°C un mínimo de 24 h.
- d. Se obtienen secciones de 10 µm con el criostato sobre portes sialinizados.

El proceso de tinción es el siguiente:

- a. Solución stock: Oil Red 0,5% en isopropanol.
- b. Se prepara la solución de trabajo (30 ml solución stock + 20 ml agua bidestilada) y se deja 10' a 4°C.
- c. Dejar los portes cortados a RT 15'.
- d. Lavar 5' en PBS.
- e. Teñir 5' con red oil.
- f. Lavar 30' con agua corriente.
- g. Teñir 5 dips con Hematoxilina de Mayers's.
- h. Lavar 10' con agua corriente.
- i. Montar el cubreobjetos en medio acuoso.

5. Resultados y discusión

5.1 Concentración de fenoles con los métodos de extracción utilizados

En el presente estudio, la extracción de fenoles se realizó mediante el uso de líquidos presurizados (PFE, Pressurized Fluid Extraction) con el equipo ASE (Acelerated Solvent Extraction) y mediante la extracción en fase sólida (μ SPE, Solid Phase Extraction) con solvente de extracción al 60 % MeOH. Antes de la purificación en μ SPE se bajó el pH a la muestra con ácido acético hasta un valor de 4 con la finalidad de concentrar los compuestos que nos interesan, ya que estos tienen más afinidad a este pH.

Antes de realizar el proceso anteriormente descrito, primero se tuvieron que utilizar distintas condiciones de purificación para estudiar la mejor opción de aislamiento de los compuestos fenólicos propios de la oliva:

- En color amarillo; extracción en ASE.
- En color naranja; extracción en ASE reduciendo el pH de la muestra a 4 con ácido acético (HAcO).
- En color verde; extracción en ASE reduciendo el pH de la muestra a 4 con ácido clorhídrico (HCL).
- En color azul claro; extracción en ASE con pH reducido a 4 con HAcO, empleando un solvente de extracción de 80 % MeOH en el proceso de μ SPE.

- En color lila; extracción en ASE con pH reducido a 4 con HAcO, empleando un solvente de extracción de 60 % MeOH en el proceso de μ SPE.

Para ver la concentración de fenoles de las muestras se realizaron análisis cromatográficos de éstas y se pasaron los resultados a una escala de mg/L (**tabla 1**).

Compound	ASE	pH4 HAcO	pH 4 HCl	SPE 80 %	SPE 60 %
Tyrosol	7,98	9,74	6,46	0,69	0,84
OHTyrosol Glu	189,59	202,86	169,93	2,78	2,66
OHTyrosol	1305,78	1782,93	1271,08	26,57	25,36
OHTyr Acetate	4,02	3,1	0,23	4,17	4,25
p-EDA	21,42	19,46	14,98	22,74	22,14
3,4-EDA	5575,67	5328,88	4170,49	4114,96	4148,65
Ligstroside derivate	277,27	306,32	248,3	204,88	209,04
p-EA	35,85	27,49	24,38	23,56	0,91
OLE derivate	8,72	47,8	305,25	171,68	171,87
3,4-EA	256,05	239,1	110,18	123,09	108,25
Ligstroside derivate	3,52	2,58	2,05	1,52	1,01
Me 3,4-EA	0	0	0	0	0
OLE	76,02	48,67	51,71	37,24	36,53

Tabla 1: Concentración de fenoles en mg/l con los diferentes métodos de purificación del estudio.

En la tabla 1 se observan los fenoles que nos interesan para realizar el estudio. Se puede ver que los extractos de ASE reducidos a pH 4 tienen menor concentración de algunos fenoles del estudio que el extracto de ASE a pH normal. Esto es debido a que al reducir el pH del extracto, aislamos los que tienen más afinidad por este pH, mientras que los que no, se eliminan. No obstante también se eliminan parte de los que sí que nos interesan.

El método de extracción en ASE bajando el pH de la muestra a 4 con HAcO presenta más concentración de fenoles que la muestra en la que se utilizó el HCL, sobretodo del fenol principal del estudio: el 3,4-EDA.

Por otro lado, se compararon muestras de extracto ASE a pH 4 con HAcO purificadas en SPE con solvente de extracción al 60 % MeOH o al 80 % MeOH y se observó que a 80 % MeOH la concentración de fenoles es ligeramente más alta, con excepción del 3,4-EDA, que se encuentra en una concentración considerablemente más alta a 60 % MeOH. Al tener como prioridad para el estudio el fenol 3,4-EDA se prefirió hacer la purificación en μ SPE al 60 % MeOH.

Para ver claramente qué fenoles se extrajeron en mayor cantidad purificando la muestra con un solvente de extracción al 60 % MeOH se pasaron los resultados a porcentaje y se realizó un gráfico circular (tabla 2) (fig. 10).

Compound	Conc. (%) a 60 % MeOH
Tyrosol	0,01775332
OHTyrosol Glu	0,05621884
OHTyrosol	0,53598111
OHTyr Acetate	0,08982333
p-EDA	0,46792673
3,4-EDA	87,681311
Ligstroside derivate	4,41803991
p-EA	0,01923276
deriv oleurop	3,6324556
3,4-EA	2,28785314
Ligstroside derivate	0,02134625
Me 3,4-EA	0
oleuropeina	0,77205797

Tabla 2: Porcentaje de fenoles del estudio a 60 % MeOH.

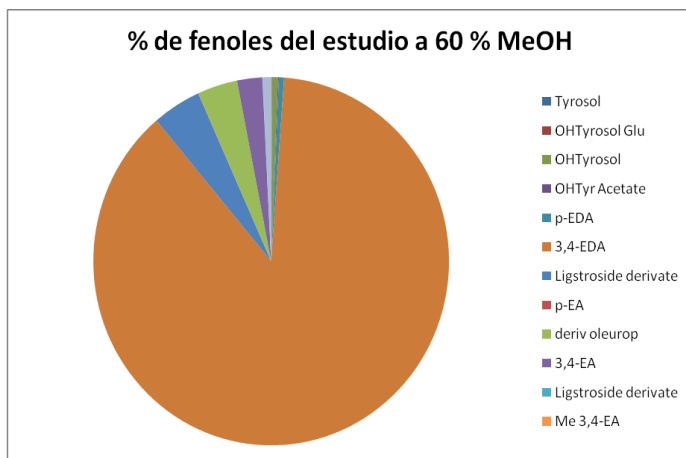


Fig. 10: Gráfico circular de los diferentes fenoles del estudio que se encuentran a pH 4 60 % MeOH

Se puede observar que el fenol más abundante es el 3,4-EDA, seguido del derivado del ligustrósido y el derivado de la oleuropeína.

5.2 Evaluación del peso de los ratones del estudio

Cada dos días se fue monitorizando el peso de los ratones y la ingesta de pienso con el objetivo de ver la variación del peso a lo largo del estudio y evaluar las posibles causas.

Se realizó un gráfico de líneas por cada sexo (**fig. 11**) (**fig. 12**). En las figuras se especifican las características de los ratones de cada jaula. Primero se tiene en cuenta el número del ratón (ratón 1, ratón 2), luego de si son ApoE o no ApoE deficientes (BL-6) y luego de si estuvieron comiendo un pienso normal (CTRL) o un pienso enriquecido con fenoles del AOVE (TTO).

Cabe resaltar que el estudio está todavía abierto y hay ratones que todavía se encuentran en la fase de tratamiento, debido a que nacieron más tarde.

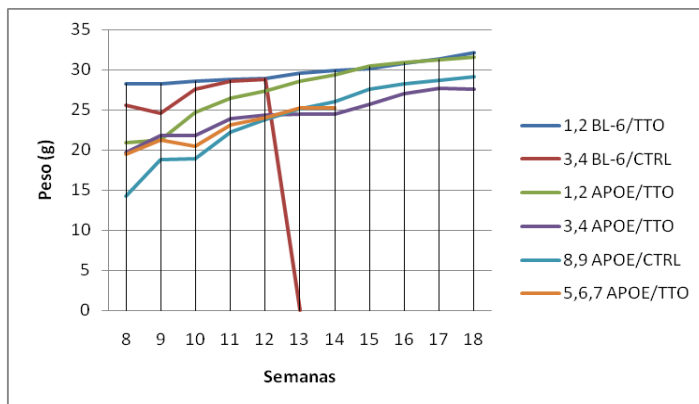


Fig. 11: Gráfico de líneas de los pesos de los ratones machos.

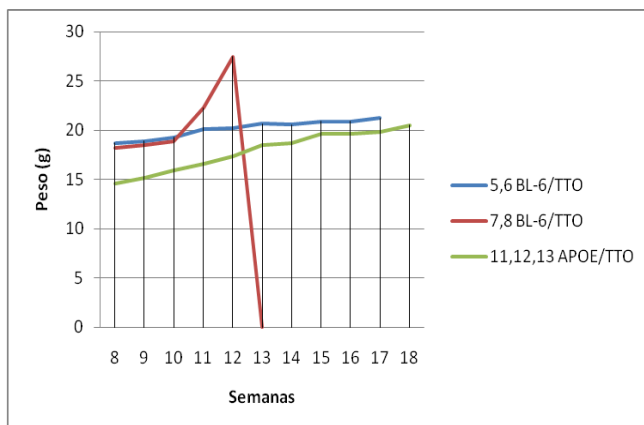


Fig. 12: Gráfico de líneas de los pesos de los ratones hembras

Todos los ratones tuvieron una ganancia de peso progresiva y sin diferencias significativas entre ellos. De este resultado se deduce que hubo un buen control de la ingesta de pienso de los ratones, ya que se

controlaba semanalmente la cantidad de pienso que necesitaban con respecto a sus pesos, y que por otra parte, no hubo variación entre los grupos del estudio.

5.3 Evaluación de hígado y vesícula biliar: resultados preliminares en ratones ApoE control y ApoE tratamiento

Después de evaluar el peso de los ratones se procedió al sacrificio. Antes de extraer los órganos a los ratones, se evaluaron y compararon los hígados y vesículas biliares en los grupos ApoE control (ApoE/CTRL) y ApoE tratamiento (ApoE/TTO). Los resultados preliminares fueron que el grupo ApoE/CTRL tuvo los hígados con un aspecto graso y las vesículas biliares inflamadas (**fig.13**), mientras que el grupo ApoE/TTO tuvo los hígados con un aspecto graso también, pero menos que los del otro grupo y las vesículas biliares no estaban inflamadas (**fig. 14**).

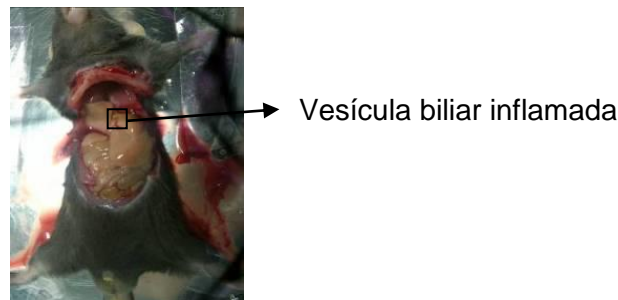


Fig. 13: Aspecto de hígado y vesícula biliar en ratón ApoE/CTRL.

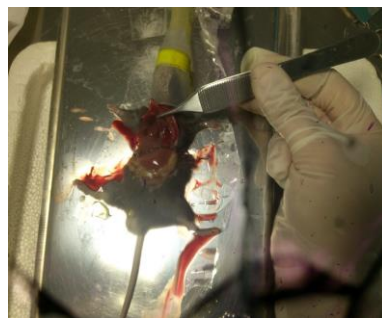


Fig. 14: Aspecto de hígado y vesícula biliar en ratón ApoE/TTO.

5.4 Evaluación del peso de los tejidos de los ratones

Al extraer los tejidos, de cada uno se realizó un gráfico de barras para observar las diferencias de peso entre los tejidos de los ratones machos y los de las hembras de los diferentes grupos, y poder establecer las posibles causas (**fig. 15-21**). Los ratones machos figuran en color azul y las hembras en amarillo.

Cabe decir que hay ratones que todavía no han sido sacrificados, razón por la cual en los gráficos no se muestran todos los grupos de ratones del estudio.

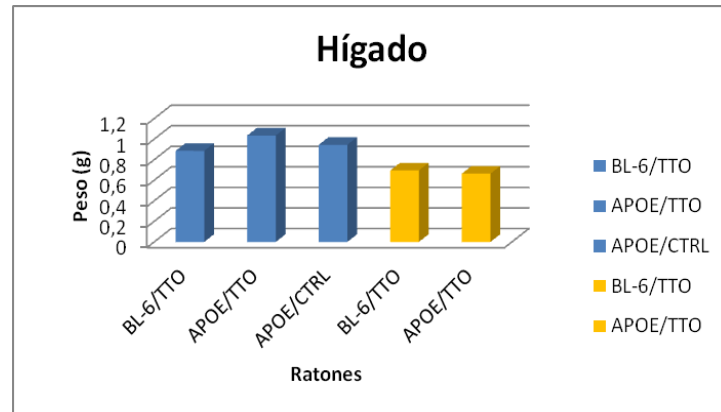


Fig. 15: Pesos del hígado de los ratones.

Se puede ver que el grupo de ratones machos ApoE/TTO es el que tuvo la media de peso del hígado más grande. En el caso de los hembras no hubo diferencias notables entre el grupo BL-6/TTO y ApoE/TTO.

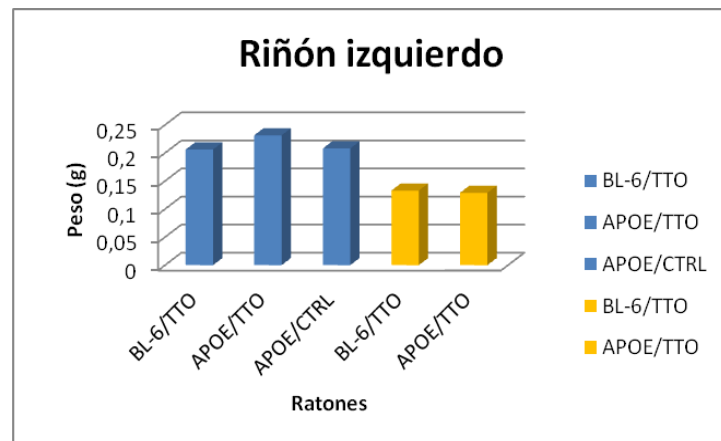


Fig. 16: Pesos de riñón izquierdo de los ratones.

Con el riñón izquierdo ocurrió lo mismo que con el hígado, el grupo de ratones machos ApoE/TTO es el que tuvo la media más elevada, mientras que en el caso de los hembras no hubo diferencias notables entre el grupo BL-6/TTO y ApoE/TTO.

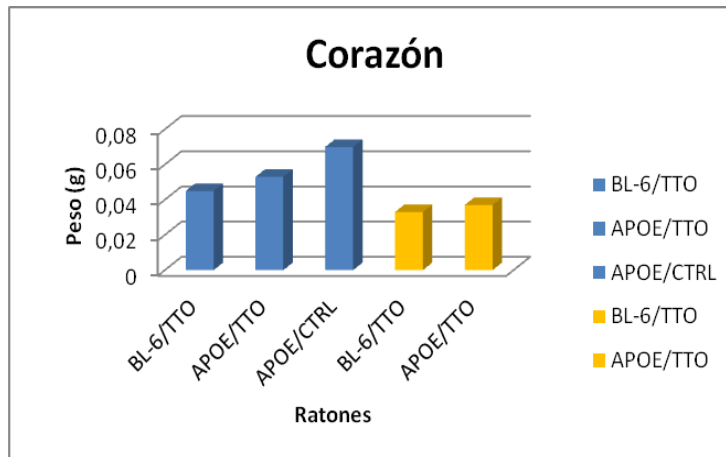


Fig. 17: Pesos del corazón de los ratones.

En los machos, el grupo de ratones ApoE/CTRL fue el que tuvo la media de peso del corazón más elevada, seguido del grupo ApoE/TTO. Debido a que el grupo ApoE/CTRL es el que más riesgo tiene para desarrollar enfermedades cardiovasculares, es posible que este grupo haya tenido una insuficiencia cardíaca y que el corazón se haya tenido que agrandar para intentar bombear al cuerpo la sangre que necesitaba. En las hembras, el grupo ApoE/TTO tuvo el corazón ligeramente más grande que el grupo BL-6/TTO.

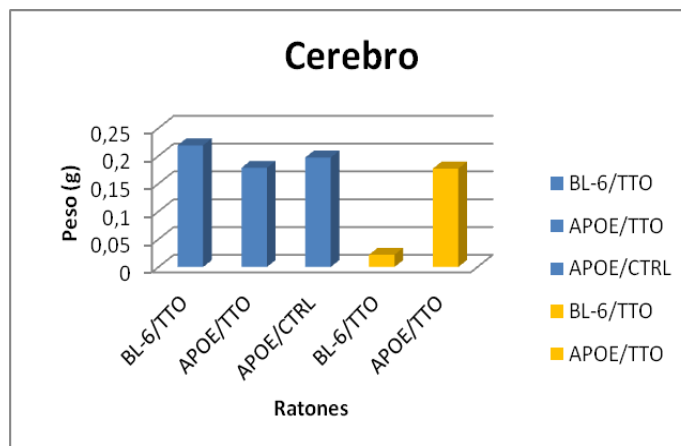


Fig. 18: Pesos del cerebro de los ratones.

Los grupos BL-6/TTO y ApoE/CTRL tuvieron los cerebros más grandes en los machos, mientras que en las hembras el grupo ApoE/TTO tuvo una media de peso mucho más elevada que el grupo BL-6/TTO.

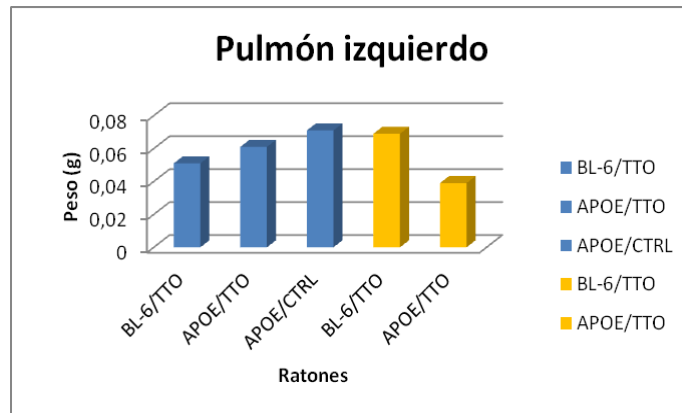


Fig. 19: Pesos del pulmón izquierdo de los ratones.

El grupo APOE/CTRL es el que tuvo una media de peso del pulmón izquierdo más elevada en los machos, mientras que en las hembras fue el grupo BL-6/TTO con diferencia.

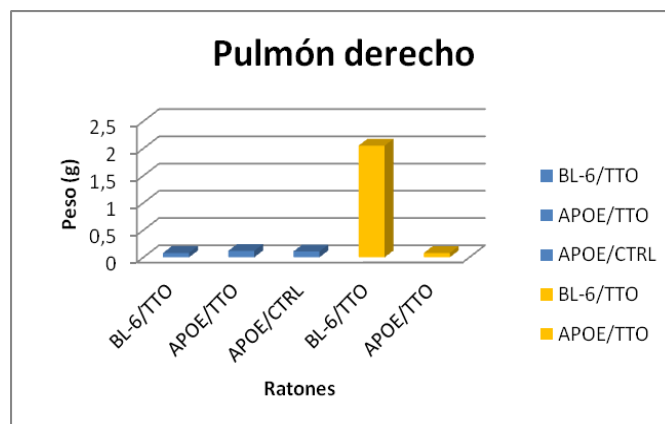


Fig. 20: Pesos del pulmón derecho de los ratones.

El grupo BL-6/TTO de las hembras fue el que tuvo la media de peso del pulmón derecho más elevada de todos los grupos de ratones con diferencia.

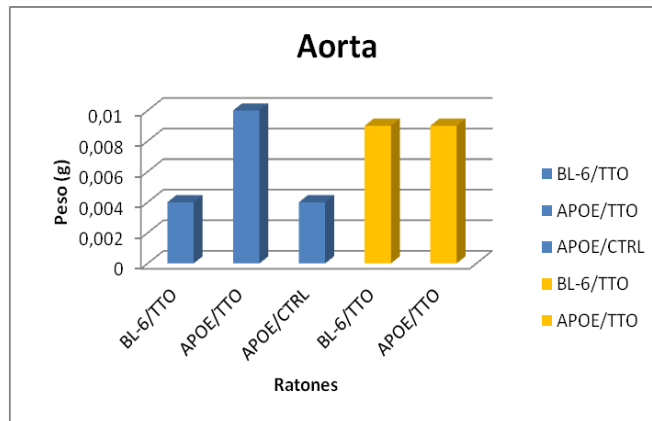


Fig. 21: Pesos de la aorta de los ratones.

El grupo de machos ApoE/TTO tuvo la media de peso de la aorta más elevada. En las hembras no hubo diferencias entre los dos grupos.

Las causas de las diferencias de tamaño de los órganos todavía no se saben con certeza. A medida que el estudio avance se irán estableciendo.

5.5 Estudio de tejidos mediante el método Oil Red Staining

Después de ser pesados, algunos tejidos fueron sumergidos en formol para su conservación y posteriormente, se les realizaron cortes histológicos desde diferentes ángulos para analizarlos con el método Oil Red Staining. Este método permite observar los depósitos de grasa que se pudieran encontrar en los tejidos.

Se analizaron corazones de ratones BL-6/TTO (**fig. 22**) (**fig. 23**) y aortas de ratones ApoE/TTO (**fig. 24**) (**fig. 25**).

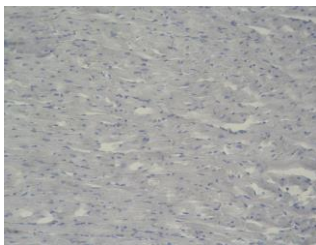


Fig. 22: Corazón de ratón BL-6/TTO

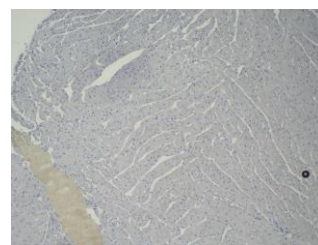


Fig. 23: Corazón de ratón BL-6/TTO

Se pueden observar en las figuras 22 y 23 los núcleos celulares del corazón (puntos de color lila) y ningún indicio de presencia de grasa (se podría observar en color rojo), al menos en estos cortes.

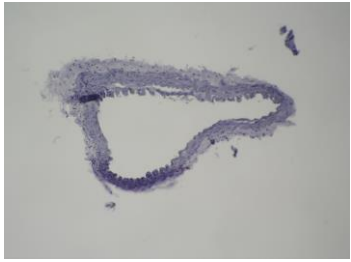


Fig. 24: Aorta de ratón ApoE/TTO

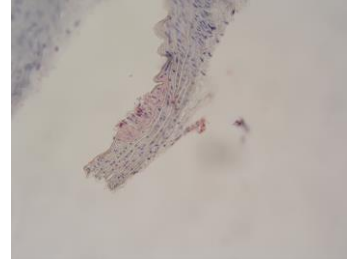


Fig. 25: Aorta de ratón ApoE/TTO

Se puede observar en la figura 24 que no hay presencia de grasa y que la luz vascular es amplia, lo cual nos muestra que no hay presencia de placas de ateroma. En la figura 25, un corte diferente del tejido, se puede observar presencia de grasa en la aorta, aunque en poca cantidad, lo cual nos muestra que el tratamiento con secoiridoides del AOVE atenuó la acumulación de lípidos.

5.6 Revisión de otros estudios relacionados

En la bibliografía existen numerosos estudios que emplean el modelo animal de ratones ApoE para la investigación de las propiedades antiaterogénicas de los compuestos fenólicos. Muchos de ellos, estudian el efecto producido por el AOVE.

Usando este modelo de ratón, en abril de 2006, Jesús Osada, Valentina Ruíz-Gutiérrez y colaboradores, realizaron un experimento de 10 semanas para estudiar si en función del tipo de extracción del aceite de oliva (presión o centrifugación) existen diferencias en cuanto a la disminución del riesgo de padecer aterosclerosis. Se concluyó que la extracción por centrifugación es la técnica que aporta más beneficios en la prevención de la aterosclerosis, al igual que el enriquecimiento en componentes minoritarios del AOVE (linoléico, fitoesteroles, tocoferoles, triterpenos y ceras) en el aceite extraído por esta técnica, reduciendo los triglicéridos plasmáticos, colesterol total y colesterol LDL. Además, el efecto beneficioso del AOVE enriquecido y obtenido por centrifugación se asoció con la reducción de la actividad de la paraoxonasa en estos ratones, el cual es un buen marcador biológico intermedio del proceso de la aterosclerosis (23).

En otro estudio, realizado en diciembre de 1998 por Lucía Calleja, Miguel A. París y colaboradores, que duró 10 semanas, se investigaba el efecto de los aceites más comúnmente utilizados en nuestras dietas en el desarrollo de la aterosclerosis en ratones ApoE deficientes. En el estudio se necesitaron 77 machos y 63 hembras de dos meses de edad separados en 7 grupos por cada sexo, un grupo fue alimentado con un pienso normal y los otros grupos fueron alimentados con pienso normal enriquecido con diferentes tipos de aceites sin adición de colesterol: de palma, de coco, dos tipos de aceite de oliva (70% y 81% de ácido

oleico) y dos tipos de aceite de girasol (22% y 76,4% de ácido oleico). Ninguna de las dietas enriquecidas indujo cambios en las concentraciones de colesterol en plasma ni incrementó el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en machos ni en hembras, mientras que los triglicéridos en plasma se redujeron de manera uniforme en todos los grupos. Por el contrario, algunas dietas causaron reducciones significativas en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en los machos y otras en las hembras; los machos respondieron más a las dietas enriquecidas con los aceites de girasol, mientras que las hembras a las enriquecidas con aceite de palma y al aceite de oliva con 81% de ácido oleico. La reducción de las lesiones de los machos que consumieron dietas enriquecidas con aceites de girasol se asoció con la disminución de triglicéridos en lipoproteínas ricas en triglicéridos, mientras que la disminución de las lesiones de las hembras que consumieron el aceite de oliva con 81% de ácido oleico o aceite de palma fue acompañado por un aumento en plasma de la ApoA-I, que tiene un rol específico en el metabolismo lipídico y es frecuentemente utilizado como biomarcador de predicción de enfermedades cardiovasculares (24).

Otro estudio, realizado en 2005 por Sergio Acín, María A. Navarro, Ricardo Carnicer, José M. Arbonés-Mainar, Mario A. Guzmán y colaboradores, con ratones ApoE y con una duración de 10 semanas, tenía como objetivo comprobar si la presencia de colesterol en la dieta puede suprimir el efecto beneficioso del aceite de oliva en retardar el desarrollo de aterosclerosis. Se necesitaron 72 ratones ApoE (43 machos y 29 hembras) de dos meses de vida, a los cuales se les separó en 4 grupos de cada sexo por niveles de colesterol y triglicéridos similares. El grupo 1 fue alimentado con pienso normal, el grupo 2 con pienso suplementado con colesterol, el grupo 3 con pienso suplementado con AOVE y el grupo 4 con pienso con colesterol y AOVE. Los resultados mostraron que la dieta enriquecida con AOVE o con colesterol, de forma separada o en conjunto induce hipercolesterolemia en los dos sexos y que la adición de colesterol a la dieta normal o a la dieta enriquecida con AOVE disminuye la ApoA-I en hembras y la actividad de la paraoxonasa (implicada en la reducción del riesgo de desarrollar aterosclerosis) en machos. Estos resultados sugieren que la mera inclusión del AOVE en las dietas occidentales es insuficiente para ver un efecto beneficioso en la aterosclerosis y que la adopción de la dieta mediterránea sería más efectiva en retardar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (25).

En otro estudio, realizado en 2006 por José M. Arbonés-Mainar, María A. Navarro, Ricardo Carnicer, Natalia Guillén, Joaquín C. Surra, Sergio Acín, Mario A. Guzmán, Jesús Osada y colaboradores, se examinó los efectos de la dieta occidental enriquecida con AOVE o aceite de palma en el perfil lipídico y el desarrollo de aterosclerosis en ratones ApoE deficientes. El estudio se dividió en dos partes y se necesitaron 70 ratones ApoE hembras. La primera parte duró 10 semanas y se utilizaron 54 ratones separados en 5 grupos (4 grupos fueron alimentados con pienso enriquecido con 0,15% de colesterol y

20% de diferentes variedades de AOVE y 1 grupo fue alimentado con pienso enriquecido con 0,15% de colesterol y 20% de aceite de palma). La segunda parte duró 4 semanas y se utilizaron 16 ratones separados en 2 grupos (1 grupo fue alimentado con pienso enriquecido con AOVE de variedad picual y el otro grupo con aceite de palma).

En comparación con las dietas que contienen aceite de palma, una dieta occidental suplementada con una de las diversas variedades de aceite de oliva virgen extra disminuye las lesiones de la aterosclerosis, reduce el tamaño de la placa y disminuye el reclutamiento de los macrófagos. Inesperadamente, la actividad de la paraoxonasa en plasma, la ApoA-I, los triglicéridos plasmáticos y el colesterol jugaron papeles de menor importancia en la regulación del desarrollo de la lesión aórtica diferencial. Dadas las propiedades antiaterogénicas evidentes del AOVE en modelos animales alimentados con una dieta occidental, se necesitan ensayos clínicos para determinar si el consumo de estos aceites es un medio seguro y eficaz para el tratamiento de la aterosclerosis **(26)**.

El estudio sobre el efecto del hidroxitirosol en el desarrollo de la aterosclerosis, realizado en 2006 por Acín S, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Guillén N, Sarría AJ, Carnicer R, Surra JC, Jesús Osada y colaboradores, empleó el modelo de ratones ApoE. Se necesitaron 21 ratones ApoE machos de 2 meses de vida, los cuales se separaron en 2 grupos (13 y 8) por niveles similares de colesterol y triglicéridos plasmáticos. Los dos grupos fueron alimentados con pienso normal; para beber al grupo control (de 13 individuos) se les administró agua, mientras que al grupo hidroxitirosol (de 8 individuos) se le administró una solución acuosa de hidroxitirosol, proporcionándoles a cada ratón una dosis de 10 mg/kg/día de hidroxitirosol.

Los datos no mostraron cambios significativos en los niveles de colesterol HDL, paraoxonasa, ApoB y triglicéridos. Sin embargo la administración de hidroxitirosol disminuyó la ApoA-I e incrementó el colesterol total, las áreas de lesión aterosclerótica y los monocitos circulantes expresando Mac-1, que es una célula receptora superficial que además se encuentra en los neutrófilos, células Natural Killer y macrófagos, y cuya inhibición atenúa la acumulación de monocitos circulantes.

Estos resultados indican que la administración de hidroxitirosol en dietas bajas en colesterol aumenta la lesión aterosclerótica asociada con el grado de activación de monocitos y remodelación de las lipoproteínas plasmáticas. Estos datos apoyan el concepto de que los productos fenólicos enriquecidos, fuera de la matriz original, podrían ser no sólo inútiles sino también perjudiciales. Nuestros resultados sugieren que la formulación de posibles alimentos funcionales debe aproximarse lo más posible al entorno natural donde se encuentran las moléculas activas

Otro estudio semejante, realizado en 2007 por Mira Rosenblat, Nina Volkova, Raymond Coleman, Yaron Almador, Michael Aviram y colaboradores, hizo una comparación entre los efectos producidos por el AOVE enriquecido con polifenoles del té verde y el AOVE sin enriquecer en los marcadores de estrés oxidativo, estado de los macrófagos y en el desarrollo de aterosclerosis en ratones ApoE deficientes. Se necesitaron 24 ratones de 6 semanas de vida, los cuales se dividieron en 3 grupos: 1 grupo que consumió AOVE (7µl/ratón/día) + galato de epicatequina, en total una concentración de fenoles de 500 mg/litro, otro grupo que consumió AOVE (7µl/ratón/día), en total 200 mg fenoles/litro y un tercer grupo que consumió agua (placebo). Los tres grupos fueron alimentados por sonda nasogástrica durante 2 meses.

El AOVE + Galato de epicatequina (pero no el AOVE) disminuyó la susceptibilidad del ratón a la peroxidación de lípidos (18%) en comparación con los ratones tratados con placebo. El principal efecto de ambos (el AOVE y el AOVE + Galato de epicatequina) estaba en el flujo de colesterol HDL mediado por los macrófagos. El consumo de AOVE aumenta la tasa de flujo de macrófagos peritoneales (MP) del ratón en un 42%, mientras que el consumo de AOVE + Galato de epicatequina lo aumentó hasta en un 139% en comparación con los MP de los ratones tratados con placebo. Al aumentar el flujo de macrófagos peritoneales del ratón disminuyó significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en un 11% o 20%, después del consumo de AOVE o AOVE + Galato de epicatequina respectivamente. Esto ocurre posiblemente debido a que al haber más macrófagos, estos no fagocitarían cantidades tan grandes de LDL oxidadas y un menor número de ellos se convertirían en células espumosas, por lo tanto la formación de estrías de grasa sería menor y las lesiones ateroscleróticas serían más leves.

Por lo tanto, este estudio concluye que el AOVE posee efectos beneficiosos antiaterogénicos, y su enriquecimiento con Galato de epicatequina ha mejorado aún más estos efectos, dando lugar a la atenuación del desarrollo de la aterosclerosis (27).

Otro estudio fue realizado en 2013 por Bohkyung Kim, Chai Siah Ku, Tho X. Pham, Youngki Park, Derek A. Martin, Liyang Xie, Rod Taheri, Jiyoung Lee, Bradley W. Bolling, en el que se quería comprobar si un extracto de *Aronia Melanocarpa* (AM) rico en polifenoles modulaba el metabolismo hepático de lípidos y mejoraba la función antioxidante en ratones ApoE deficientes alimentados con dietas altas en grasas y colesterol. Se necesitaron 30 ratones ApoE deficientes machos de 8 semanas de vida, los cuales se repartieron aleatoriamente en 3 grupos: un grupo control (10 individuos), que fue alimentado con una dieta que contenía un 15% de grasas con un 0,2 % de colesterol, otro grupo (10 individuos) que fue alimentado con una dieta que tenía el mismo porcentaje de grasas y colesterol que el anterior, pero suplementada con 0,005 % de un extracto de AM, y un tercer grupo (10 individuos) alimentado con una dieta con el mismo porcentaje de grasas y colesterol que los anteriores pero suplementado con 0,05 % de un extracto de AM.

Los resultados fueron que el grupo que consumió una dieta suplementada con un 0.05% del extracto de AM tenía un 12% menos de colesterol total plasmático que el grupo control. A pesar del efecto hipocolesterolémico del extracto de AM, los niveles de ARNm hepáticos del receptor de lipoproteínas de baja densidad, hidroxilo-3-metilglutaril coenzima A reductasa y colesterol 7 α -hidroxilasa en ratones alimentados con el extracto de AM no fueron significativamente diferentes de los controles. La suplementación en la dieta con el extracto de AM no alteró el contenido hepático lipídico o la expresión hepática de los genes implicados en la lipogénesis y la β -oxidación de ácidos grasos, tales como ácido graso sintasa, la carnitina palmitoiltransferasa 1 y acil-CoA oxidasa. La actividad de la paraoxonasa y la catalasa fueron especialmente incrementadas en los ratones suplementados con 0,05 % del extracto de AM. Ambas dietas con el extracto de AM aumentaron la actividad hepática de la glutatión peroxidasa (GPx).

Se concluye que el extracto de AM redujo el colesterol total y mejoró la función antioxidante hepática y plasmática a dosis nutricionalmente relevantes en ratones ApoE deficientes. Además, el mecanismo para reducir el colesterol del extracto de AM en ratones ApoE deficientes fue independiente de la expresión hepática de los genes implicados en el metabolismo del colesterol (28).

6. Conclusiones

El fenol más abundante, con diferencia, fue el 3,4-EDA, con una concentración del 87,68 % de los fenoles del estudio. No obstante, no se puede decir que éste fenol es el principal responsable de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos del AOVE en la aterosclerosis, ya que, como se mencionó anteriormente, no es el fenol que más concentración presenta en los alimentos el que ejerce la actividad biológica en el organismo, sino el que más grado de absorción en tejidos diana presenta, debido a su estructura química. No es posible extraer una conclusión sobre esta afirmación, ya que todavía no tenemos resultados de los fenoles que se encuentran en los tejidos analizados.

Debido a que no hubieron diferencias significativas entre los grupos de ratones con respecto a los pesos, en este estudio, no se estableció una relación entre el tipo de ingesta de los ratones (pienso normal o pienso enriquecido con secoiridoides del AOVE), la presencia de la Apolipoproteína E o el Knock-out de ésta y el peso.

Los resultados preliminares de hígado y vesícula biliar de los grupos de ratones ApoE/CTRL y ApoE/TTO muestran diferencias de estos tejidos entre los dos grupos, otorgando una acción beneficiosa

frente a las enfermedades cardiovasculares a los secoiridoides del AOVE, ya que éstos disminuyeron la acumulación de grasa e inflamación de los tejidos de los ratones.

Las causas de las diferencias de tamaño de los tejidos entre los grupos de ratones todavía no están claras. Tampoco hubo una diferencia clara entre los grupos. De todas formas las causas se irán estableciendo a medida que avance el estudio.

En la evaluación de tejidos de corazón y aorta en ratones BL-6/TTO y ApoE/TTO con el método Oil Red Staining, se vieron diferencias entre los dos grupos, otorgando una acción beneficiosa al tratamiento con secoiridoides en la acumulación de lípidos en los tejidos. Los secoiridoides, por lo tanto, atenúan la progresión de aterosclerosis en ratones ApoE y previenen la aparición en ratones BL-6.

Con respecto a otros estudios relacionados, se concluye que la extracción por centrifugación del AOVE y los componentes minoritarios de éste, ejercen un efecto beneficioso en cuanto a la prevención de lesiones ateroscleróticas. Por otro lado, el aceite de girasol en los machos y el aceite de oliva al 81 % de ácido oleico y el aceite de palma en las hembras, ejercen beneficios en la disminución de lesiones ateroscleróticas con dependencia del sexo, aunque los beneficios del aceite de palma se discuten en otros estudios.

En otro estudio se concluye que la mera inclusión del AOVE en las dietas occidentales es insuficiente para ver un efecto beneficioso en la aterosclerosis y que la adopción de la dieta mediterránea sería más efectiva en retardar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

La conclusión en otro estudio es que la formulación de posibles alimentos funcionales debe aproximarse lo más posible al entorno natural donde se encuentran las moléculas activas, ya que sino, podrían ejercer efectos perjudiciales.

Otros estudios sugieren que fenoles de otras fuentes alimentarias en combinación con los fenoles del AOVE o por separado, también ejercen beneficios en la aterosclerosis.

7. Bibliografía

1. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. Jan [cited 2015 Jan 15];2(5):270–8.
2. Platelets - 18(3):224 - PDF, Informa Healthcare [Internet]. [cited 2015 Jun 28].
3. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2015 Jun 28];71(5):1062–76.
4. Rodríguez G, Mago N, Rosa F. El papel de la inflamación en la aterogénesis. *Invest Clin* [Internet]. Universidad del Zulia; [cited 2015 Jun 28];50(1):109–29.
5. Inzé D, Montagu M Van. Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 1995 Jan [cited 2015 Jun 21];6(2):153–8.
6. Knorzer OC, Durner J, Boger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol Plant* [Internet]. 1996 Jun [cited 2015 Jun 28];97(2):388–96.
7. Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* [Internet]. 2003 May [cited 2015 Jun 28];118(1):21–8.
8. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 1999 Sep [cited 2015 Jun 28];37(9-10):949–62.
9. Tausz M, Wonisch A, Grill D, Morales D, Jiménez MS. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *J Exp Bot* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2015 Jun 28];54(387):1505–10.
10. Dixon RA, Paiva NL. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* [Internet]. 1995 Jul [cited 2015 Feb 16];7(7):1085–97.
11. Díaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* [Internet]. 2001 Jun [cited 2015 Jun 28];161(1):179–88.
12. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2015 Jun 28];79(5):727–47.
13. Spencer JP., Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* [Internet]. 1999 Sep [cited 2015 Jun 28];458(2):224–30.

14. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2000 May [cited 2015 Jun 28];71(5):1062–76.
15. Visioli F, Galli C. Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2002 May [cited 2015 Jun 28];42(3):209–21.
16. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1998 Jun 9 [cited 2015 Jun 25];247(1):60–4.
17. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res* [Internet]. 1995 Apr [cited 2015 Jun 28];78(2):151–60.
18. De La Cruz JP, Villalobos MA, Carmona JA, Martín-Romero M, Smith-Agreda JM, de la Cuesta FS. Antithrombotic potential of olive oil administration in rabbits with elevated cholesterol. *Thromb Res* [Internet]. 2000 Nov 15 [cited 2015 Jun 28];100(4):305–15.
19. Damasceno NRT, Pérez-Heras A, Serra M, Cofán M, Sala-Vila A, Salas-Salvadó J, et al. Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2011 Jun [cited 2015 Jan 2];21 Suppl 1:S14–20.
20. Cano Marchal P, Gómez Ortega J, Aguilera Puerto D, Gámez García J. Situación actual y perspectivas futuras del control del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. *Rev Iberoam Automática e Informática Ind RIAI* [Internet]. 2011 Jul [cited 2015 Jun 28];8(3):258–69.
21. González A, López B, Beaumont J, Ravassa S, Arias T, Hermida N, et al. La genómica y la proteómica en la investigación de la insuficiencia cardíaca. *Rev Española Cardiol* [Internet]. Elsevier; 2009 Mar 1 [cited 2015 Jun 28];62(3):305–13.
22. Suárez M, Romero M-P, Macià A, Valls RM, Fernández S, Solà R, et al. Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2015 Jun 28];877(32):4097–106.
23. Acín S, Navarro MA, Perona JS, Arbonés-Mainar JM, Surra JC, Guzmán MA, et al. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2007 Jun [cited 2015 Jun 28];18(6):418–24.
24. Calleja L, Paris MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jimenez A, et al. Low-Cholesterol and High-Fat Diets Reduce Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2015 Jun 28];19(10):2368–75.
25. Acín S, Navarro MA, Carnicer R, Arbonés-Mainar JM, Guzmán MA, Arnal C, et al. Dietary cholesterol suppresses the ability of olive oil to delay the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* [Internet]. 2005 Sep [cited 2015 Jun 28];182(1):17–28.

26. Arbonés-Mainar JM, Navarro MA, Carnicer R, Guillén N, Surra JC, Acín S, et al. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: A role for small, dense high-density lipoproteins. *Atherosclerosis* [Internet]. 2007 Oct [cited 2015 Jun 28];194(2):372–82.
27. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Almagor Y, Aviram M. Antiatherogenicity of extra virgin olive oil and its enrichment with green tea polyphenols in the atherosclerotic apolipoprotein-E-deficient mice: enhanced macrophage cholesterol efflux. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2008 Aug [cited 2015 Jun 28];19(8):514–23.
28. Kim B, Ku CS, Pham TX, Park Y, Martin DA, Xie L, et al. Aronia melanocarpa (chokeberry) polyphenol-rich extract improves antioxidant function and reduces total plasma cholesterol in apolipoprotein E knockout mice. *Nutr Res* [Internet]. 2013 May [cited 2015 May 21];33(5):406–13.